

УДК 575.22+577.21:582.912.46

Н. В. ВОДЧИЦ

ПРИМЕНЕНИЕ ISSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ РАСТЕНИЙ РОДА *VACCINIUM*

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь,
e-mail: vodna76@mail.ru

Генотип четырех сортов голубики щитковой (*Vaccinium corymbosum*), двух сортов-гибридов *V. angustifolium* × *V. corymbosum* и черники обыкновенной анализировали с помощью пяти ISSR-праймеров (UBC 808, 818, 824, 845, 867), с помощью которых было выявлено 128 маркерных фрагмента. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 22,7 % были общими для всех сортов. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов. Полученные маркеры можно использовать для паспортизации и сертификации растений рода *Vaccinium*.

Ключевые слова: заякоренные праймеры, межтандемные сегменты, микросателлиты, маркеры.

N. V. VODCHITS

THE ASSESSMENT OF ISSR MARKERS APPLICATION TO GENETIC TYPING AND CERTIFICATION OF *VACCINIUM* PLANTS

Paleski State University, Pinsk, Belarus, e-mail: vodna76@mail.ru

Genotypes of four *Vaccinium corymbosum* cultivars and two cultivars of *V. angustifolium* × *V. corymbosum*, along with wild individuals of *V. myrtillus*, were analyzed using five inter-simple sequence repeat (ISSR) primers (UBC 808, 818, 824, 845, 867). The primers produced 128 bands on the whole; 22.7 % of the bands were common to all blueberry cultivars. In the case of *V. myrtillus*, 68.0 % of its bands were identical with monomorphic bands in cultivated blueberries. The obtained sets of consistent bands can be considered as cultivar passports and they can be used for *Vaccinium* cultivars certification. Cluster analysis of genetic similarity between cultivars, based on ISSR profiles, is provided.

Keywords: anchored primers, microsatellites, markers.

Введение. Активное развитие голубиководства в Республике Беларусь началось в начале XXI в., после того как вступили в стадию полного плодоношения первые промышленные насаждения данной культуры. Этому предшествовала исследовательская работа по определению наиболее пригодных и хозяйственно ценных сортов с определенным экологическим потенциалом [1]. С увеличением числа новых сортов все более важным становится процесс регистрации культурного сорта, его сертификации и защиты авторских прав селекционеров. Генетическая паспортизация представляет собой метод получения генетически детерминированных характеристик с помощью морфологических или молекулярных маркеров [2]. В настоящее время разработано большое количество типов молекулярно-генетических маркеров [3]. Метод ISSR основан на анализе участков ДНК, расположенных между микросателлитными повторами, диспергированными по всему растительному геному, и обеспечивает воспроизводимый результат при детекции большого числа локусов [4].

Цель данного исследования – ДНК-паспортизация и сертификация ряда сортов голубики и черники обыкновенной на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов с целью идентификации сортов, проверки чистосортности маточных насаждений и посадочного материала.

Материалы и методы исследований. Исследования проведены на базе научно-исследовательской лаборатории прикладной и фундаментальной биотехнологии биотехнологического

факультета учреждения образования «Полесский государственный университет» (далее БТФ ПолесГУ).

Объектом исследования явились полугодовые растения голубики щитковой – *Vaccinium corymbosum* L. (сорта Bluecrop, Northland, Reka, Denis blue, Northblue и Bluejay), произведенные методом клонального микроразмножения *in vitro* на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве БТФ ПолесГУ. Кроме того, для сравнения в исследование был включен дикорастущий вид брусничных – черника обыкновенная (*V. myrtillus* L.), произрастающая в лесах Пинского района.

Выделение ДНК проводили СТАВ-методом, с небольшими модификациями применительно к объекту исследования [5, 6]. ДНК изолировали из 0,03 г молодых тонких стеблей каждого сорта, без очистки РНКазой. Препарат ДНК растворяли в 50 мкл деионизированной воды. Растворы нуклеиновых кислот хранили при –20 °С.

Реакционная смесь для проведения ПЦР (объем 25 мкл) включала следующие компоненты: 10 × ПЦР-буфер «А», 50 мМ MgCl₂, 10 мМ dNTP-mix, 20 пмоль праймера, 20 нг ДНК, 2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (все производства PrimeTech, Беларусь, за исключением dNTP-mix производства Carl Roth, Германия). Полимеразные цепные реакции проводили в термоциклере Biometra. Для праймеров UBC 818, UBC 824 и UBC 845 устанавливали следующую программу: 94 °С – 30 с; 94 °С – 1 мин, 50 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин (40 циклов); 72 °С – 5 мин. Для праймеров UBC 808 и UBC 867 устанавливали следующие режимы: 94 °С – 10 мин; 94 °С – 1 мин, 46,5 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин (35 циклов); 72 °С – 10 мин.

Длину фрагментов амплифицированной ДНК оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 2 %-ном агарозном геле [7]. Для определения длины фрагментов ДНК использовали размерные маркеры 100 bp Plus DNA Ladder (производства Thermo Scientific, Литва), 766 bp и 1 Kb DNA Ladder (производства PrimeTech, Беларусь).

Для анализа геномов растений применяли пять 3'-заякоренных ISSR-праймеров (табл. 1), последовательности которых были взяты из работ [8–10].

Т а б л и ц а 1. Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования сортов голубики

Праймер	Последовательность 5'→3'	Температура отжига T_m , °С	GC, %
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	46,5	53
UBC 818	CACACACACACACAG	50	53
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	50	53
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG	50	50
UBC 867	GGCGGCGGCGGCGCGGC	46,5	100

П р и м е ч а н и е. R равен А или G.

Для визуализации результатов электрофореза использовали прибор гель-документирования Quantum ST4 [7]. Уровень полиморфизма определяли как отношение числа полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов у сортов голубики, детектируемых с помощью каждого праймера, и выражали в процентах.

Для количественной оценки полиморфизма полученные данные представляли в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие в электрофоретических спектрах одинаковых по размеру ампликонов рассматривали как состояние 1 или 0 соответственно. Статистическую обработку результатов и построение дендрограмм осуществляли с помощью кластерного анализа методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), в программе STATISTICA 6.0. В данном методе расстояние между двумя различными кластерами вычисляется как среднее расстояние между всеми парами объектов в них [11].

Результаты и их обсуждение. Использованные ISSR-праймеры содержали последовательности ди- и тринуклеотидных микросателлитных мотивов с добавлением якорного нуклеотида на 3'-конце (табл. 1). Они выявили для каждого исследуемого образца воспроизводимые специфичные электрофоретические спектры ISSR-фрагментов.

Во избежание ошибочных заключений о полиморфизме проведено 6-кратное повторение процедуры амплификации ДНК, выделенной из одного и того же источника. В исследованных нами профилях учитывались только стабильные при амплификации фрагменты. Данные о спектрах ампликонов, полученных с помощью ISSR-праймеров, приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Характеристика ISSR-спектров ампликонов растений рода *Vaccinium*

Праймер	Число маркеров		К-во полиморфных маркеров	Уровень полиморфизма, %	Число уникальных маркеров		Границы длин локусов в спектре, п. н.
	Голубика	Черника	Голубика	Голубика	Голубика	Черника	
UBC 808	17	10	13	76.5	4	4	260–1065
UBC 818	24	16	18	75.0	9	7	240–2000
UBC 824	24	14	17	70.8	6	1	440–1890
UBC 845	24	10	19	79.2	5	3	230–1600
UBC 867	21	8	18	85.7	8	3	350–1875

При электрофорезе основная зона разделения фрагментов находилась в пределах 230–2000 п. н. В целом учитывалось 128 амплифицированных фрагмента – 110 для голубики (в среднем 22,0 маркера на праймер) и 58 – для черники (в среднем 11,6 маркера на праймер). Число маркеров для голубики варьировалось от 17 с праймером UBC 808 до 24 с праймерами UBC 818, 824 и 845, для черники – от 8 с праймером UBC 867 до 16 с праймером UBC 818. Из общего числа ISSR-фрагментов голубики 85 (77,3 %) были полиморфны у изученных генотипов, а 25 (22,7 %) были общими для всех сортов; 17 (68,0 %) локусов, детектируемых у черники, совпадали с мономорфными фрагментами голубики. Самый высокий процент полиморфных ISSR-фрагментов – 85,7 % (у 18 из 21) – получен при амплификации ДНК с праймером UBC 867 (рис. 1). Самый низкий процент выявлен в случае праймера UBC 824 – 70,8 % (17 из 24) фрагментов были полиморфны (рис. 2). Средний уровень полиморфизма между исследуемыми сортами составлял 77,4 %.

Определенная часть (32 (25,0 %)) выявленных маркеров у голубики относится к редким, т. е. они встречались только один раз среди анализируемых генотипов. Отношение числа генотип-специфических маркеров к общему числу ампликонов у 14,1 % *V. myrtillus* составило 18. С помощью

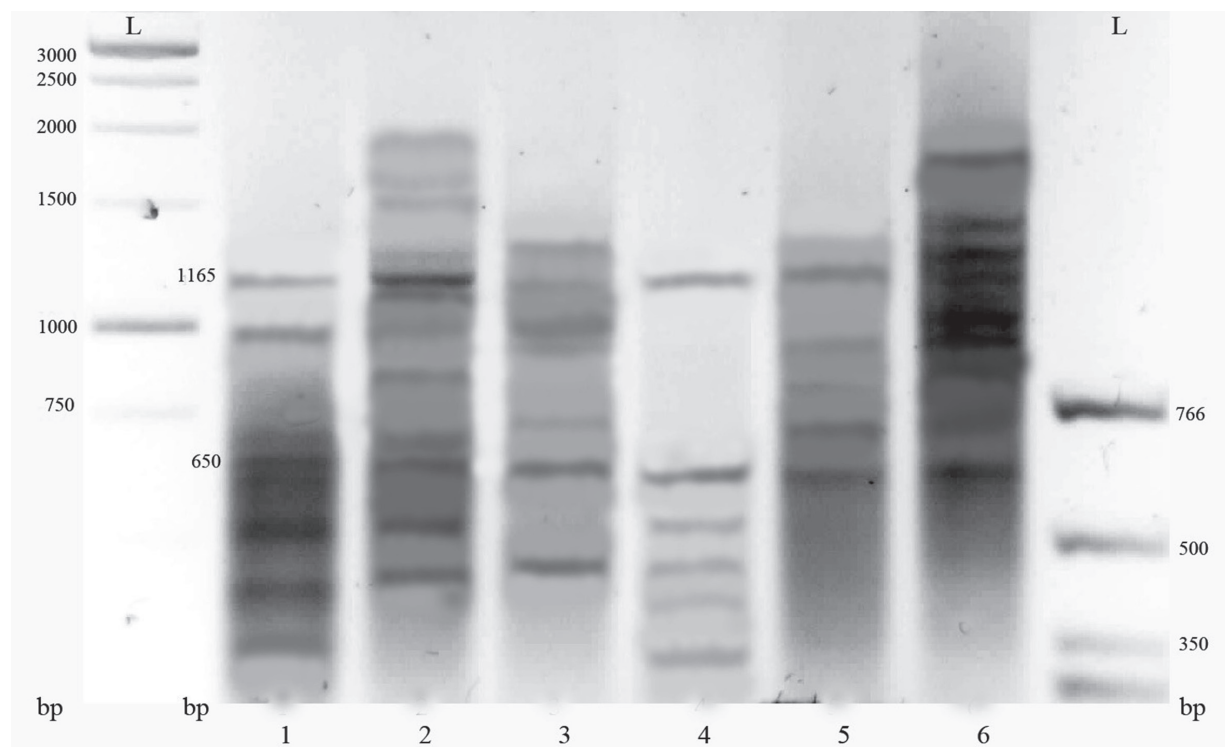


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 867. Сорта: 1 – Bluecrop, 2 – Northland, 3 – Reka, 4 – Denis blue, 5 – Northblue, 6 – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

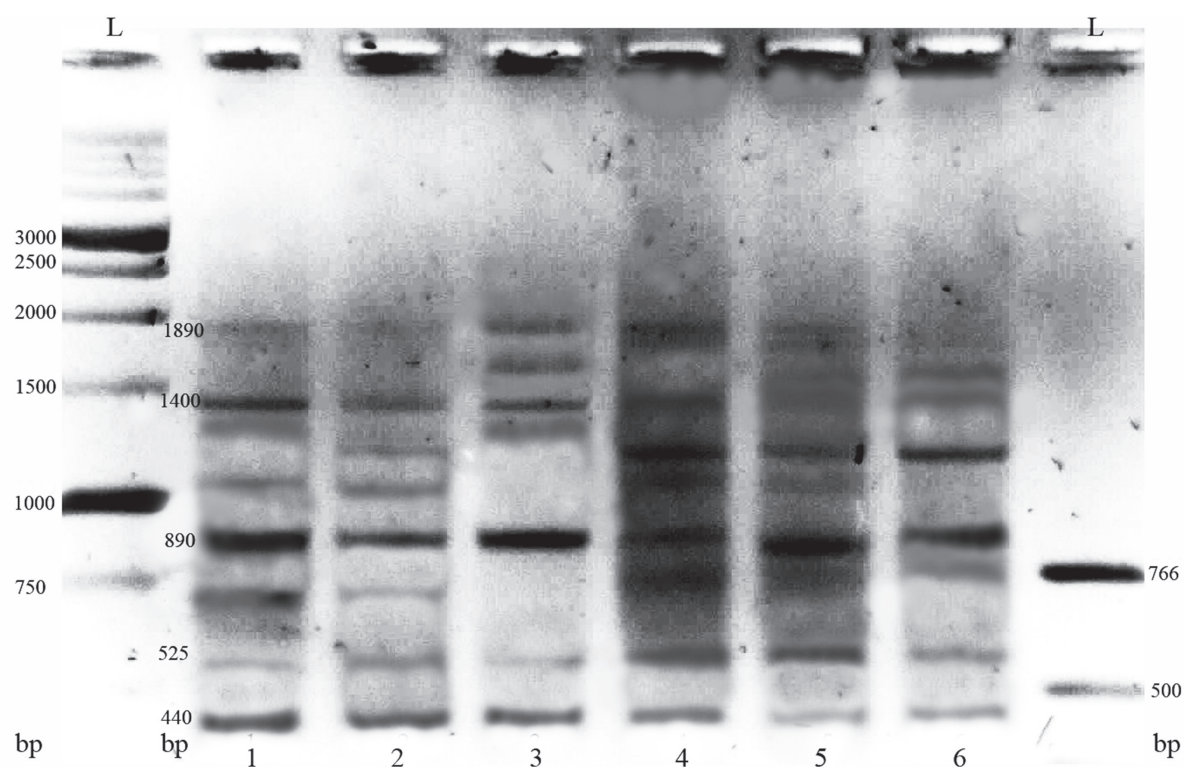


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ISSR-ПЦР для сортов голубики с праймером UBC 824. Сорта: 1 – Bluecrop, 2 – Northland, 3 – Reka, 4 – Denis blue, 5 – Northblue, 6 – Bluejay. L – стандарт длин фрагментов (bp)

исследуемых праймеров выявлены уникальные фрагменты, которые в дальнейшем можно использовать для создания SCAR-маркеров.

У всех праймеров обнаружен 100 %-ный полиморфизм между проанализированными сортами, что и позволило их различить (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Аллельный полиморфизм ISSR-маркеров растений рода *Vaccinium*

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Bluecrop	300, 450, 500, 550, 580, 615, 660, 790, 880, 930, 1000, 1060, 1180, 1290	440, 525, 630, 670, 715, 810 , 830, 890, 990, 1050, 1400, 1430 , 1500, 1655, 1790, 1890	335, 390, 405, 445, 475 , 510, 685, 760, 840	325, 410, 505, 530, 705, 730, 895, 1005 , 1250	350, 430, 455, 540 , 610, 650, 710 , 800, 1165
Northland	300, 330, 400 , 450, 500, 550, 580, 615, 660, 750, 790, 880, 930, 1060, 1260, 1590 , 2000	440, 525, 670, 715, 890, 1050, 1110, 1150, 1210, 1400, 1655, 1890	260 , 335, 405, 445, 510, 560, 685, 760, 820	230, 325, 360, 410, 505, 530, 600, 705, 730, 895, 1080, 1250, 1600	470, 650, 745, 800, 855, 965, 1070, 1165, 1265, 1510, 1630, 1820
Reka	300, 330, 450, 500, 550, 615, 660, 750, 790, 880, 930, 1000, 1060, 1260, 1330	440, 525, 670, 715, 830, 890, 1050, 1150, 1280, 1400, 1500, 1750, 1790, 1890	290, 335, 390, 405, 445, 510, 560, 605, 685, 760, 820, 870, 940	310, 325, 410, 460, 505, 640, 705, 815, 895, 935, 1080, 1200, 1600	470, 610, 650, 800, 855, 965, 1070, 1165, 1265, 1420
Denis blue	300, 330, 450, 500, 550, 580, 615, 660, 790, 880, 1060, 1260, 1440, 1690 , 2000	440, 525, 670, 715, 890, 1050, 1110, 1210, 1400, 1655, 1750, 1890	290, 335, 405, 445, 510, 560, 605, 685, 760, 820, 1065	230, 310, 325, 360, 410, 460, 505, 530, 570 , 640, 705, 895, 935, 1155 , 1200	350, 430, 470, 555 , 650, 745, 1070, 1165

Сорт	Праймер/локусы				
	UBC 818	UBC 824	UBC 808	UBC 845	UBC 867
Northblue	300, 450, 500, 550, 615, 660, 790, 1060	440, 525, 585, 670, 715, 890, 945 , 1090 , 1210, 1280, 1400, 1890	290, 390, 445, 510 , 560, 605, 685, 760, 820, 870, 940	325, 410, 460, 505, 600, 640, 705, 730, 895, 1080, 1200, 1250	650 , 745, 800, 965, 1070, 1165
Bluejay	240 , 300, 330, 375, 450, 500, 580, 615, 790, 930, 1060	440, 525, 585, 670, 715, 830, 890, 1110, 1210, 1400, 1790, 1890	290, 445, 510, 685, 760, 870, 940	230, 250 , 325, 360, 410, 505, 640, 705, 815, 895, 1040 , 1250	650, 745, 800, 1070, 1165, 1265, 1420, 1720
Черника	300, 330, 380 , 450, 465 , 530 , 660, 680 , 790, 880, 960 , 1060, 1210 , 1330 , 1440, 1490	440, 525, 670, 740 , 830, 890, 1050, 1110, 1210, 1400, 1655, 1750, 1890	260, 335, 390, 475, 560, 620 , 720 , 760, 795 , 900	310, 380 , 410, 505, 600, 705, 935, 1055 , 1115 , 1250	350, 555, 650, 710, 835 , 925 , 1165, 1875

Примечание. Жирным шрифтом обозначены уникальные фрагменты; курсивом – мономорфные фрагменты; локусы, совпавшие с таковыми в других работах, опубликованных ранее, подчеркнуты.

Наши результаты частично согласуются с полученными ранее в другой лаборатории данными по ISSR-анализу сортов голубики высокой с праймерами UBC 818 и UBC 824 [8].

На основании комплекса данных о частоте встречаемости аллелей и о размере амплифицированных последовательностей для каждой аллели проведена оценка степени генетического сходства изученных генотипов.

Согласно результатам, представленным на дендрограмме, как и следовало ожидать, наиболее удаленной от сортов голубики оказалась черника обыкновенная из естественных популяций (рис. 3), для которой дистанции, выраженные величиной, обратной коэффициенту Пирсона, находились в диапазоне от 0,88 (по отношению к сорту Denis blue) до 1 (по отношению к сорту Reka).

Генотипы сортов голубики, за исключением сорта Bluecrop, сформировали два кластера, т. е. группы с меньшей внутригрупповой изменчивостью признаков по сравнению с изменчивостью в совокупности. В первый вошли сорта Nortland и Denis blue, во второй – сорта Reka, Northblue и Bluejay. Сорт Bluecrop отличался от геномов исследуемых сортов голубики,

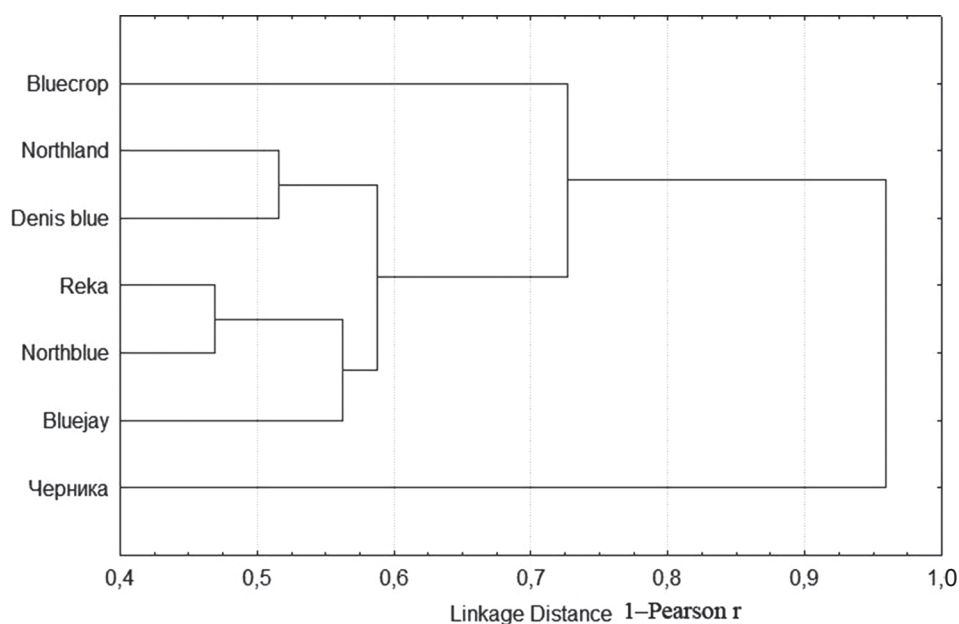


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства, основанная на данных ISSR-анализа сортов голубики и черники обыкновенной

и коэффициент генетической дистанции его от других сортов составил от 0,70 до 0,75. Сорт голубики Bluecrop и черника обыкновенная, обладающие наибольшим количеством уникальных ISSR-локусов, образовали отдельные ветви дендрограммы. Генетическое расстояние между изученными представителями голубики варьировалось от 0,47 (между сортами Reka и Northblue) до 0,75 (между сортами Bluecrop и Denis blue; Bluecrop и Bluejay). Следует отметить, что межвидовые гибриды *V. corymbosum* и *V. angustifolium* L. – Northblue, Northland распределились в разные группы, а генетическое расстояние между ними составило 0,55.

Можно предположить, что вошедшие в отдельные кластеры сорта – {Northland, Denis blue}, а также {Reka, Northblue, Bluejay} – имеют генотипически сходные родительские формы.

Заключение. Впервые в Беларуси проведен молекулярно-генетический сравнительный анализ сортов голубики с применением только ISSR-подхода. Исследование растений четырех сортов *V. corymbosum*, двух сортов от гибридизации – *V. angustifolium* × *V. corymbosum* (Northland и Northblue) и *V. myrtillus* – показало наличие мономорфных для всех ISSR-фрагментов. Следовательно, можно сделать вывод, что ISSR-маркеры применимы при исследовании как внутривидового, так и межвидового генетического полиморфизма растений. При одинаковом наборе праймеров у черники с голубикой совпало 68,0 % мономорфных фрагментов, а число уникальных маркеров для черники составило 14,1 % относительно всех выделенных фрагментов. Это доказывает, что голубика и черника являются отдаленными видами одного рода и семейства.

На основании полученных данных ISSR-спектров и проведенного кластерного анализа получены данные о генетическом родстве исследованных генотипов растений рода *Vaccinium*.

В целях повышения эффективности генетических исследований полученные ранее результаты необходимо расширить за счет включения новых маркеров, обладающих иными аллелями, которые могут быть полезны для разработки селекционных программ.

Список использованной литературы

1. Титок, В. В. Голубика высокорослая – инновационная культура премиум-класса / В. В. Титок, А. А. Веевник, Н. Б. Павловский // Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы: материалы Респ. науч.-практ. конф., Минск, 17 авг. 2012 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси, редкол.: В. В. Титок (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2012. – С. 5–8.
2. Бобошина, И. В. Идентификация перспективных для Урала сортов пшеницы мягкой с использованием межмикросателлитного анализа полиморфизма ДНК / И. В. Бобошина, С. В. Боронникова // Фунд. исслед. – 2013. – № 6 (1). – С. 92–97.
3. Карлов, Г. И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / Г. И. Карлов; Рос. гос. аграр. ун-т. – М., 2009. – 50 с.
4. Оценка генетической разнородности линий томата на основе технологии ISSR-PCR / В. Н. Кавцевич [и др.] // Вес. БДПУ. Сер. 3. – 2013. – № 3. – С. 18–23.
5. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Весн. Палеск. дзярж. ун-та. Сер. прыродазнаўч. навук. – 2014. – № 2. – С. 25–30.
6. Rapid DNA extraction from ferns for PCR-based analyses / E. L. Dempster [et al.] // Biotechnology. – 1999. – Vol. 27, N 1. – P. 66–68.
7. Водчиц, Н. В. Выявление генетической разнородности сортов голубики методом ISSR-маркирования / Н. В. Водчиц, Е. О. Юрченко, А. А. Вологович // Инновационные технологии в науке и образовании: материалы IV Междунар. науч.-практ. конф., Чебоксары, 18 дек. 2015 г. / редкол.: О. Н. Широков (отв. ред.) [и др.]. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2015. – № 4 (4). – С. 15–19.
8. Сертификация сортов голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.), районированных в Беларуси, на основе RAPD- и ISSR-маркеров / А. Б. Власова [и др.] // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 203–210.
9. Debnath, S. C. Development of ISSR markers for genetic diversity studies in *Vaccinium angustifolium* / S. C. Debnath // Nordic J. Bot. – 2009. – Vol. 27, N 2. – P. 141–148.
10. Application of inter-simple sequence repeats relative to simple sequence repeats as a molecular marker system for indexing blueberry cultivars / M. Garriga [et al.] // Can. J. Plant Sci. – 2013. – Vol. 93, N 5. – P. 913–921.
11. Леончик, Е. Ю. Кластерный анализ: терминология, методы, задачи / Е. Ю. Леончик; ОНУ им. И. И. Мечникова, ИМЭМ. – 2-е изд., испр. и доп. – Одесса, 2011. – 67 с.

Поступила в редакцию 23.05.2016